

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/86, 9/00, C07K 14/00, A61K 48/00		A1		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/27070
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/01202		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Oktober 1995 (12.10.95)		
(22) Internationales Anmeldedatum: 31. März 1995 (31.03.95)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		
(30) Prioritätsdaten: P 44 11 402.8 31. März 1994 (31.03.94) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>		
(71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHRADER, Jürgen [DE/DE]; Meliesallee 13, D-40597 Düsseldorf (DE).				
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GÖDECKE, Axel [DE/DE]; Gänsestrasse 10, D-40593 Düsseldorf (DE).				
(74) Anwälte: KOLB, Helga usw.; Hoffmann, Eitle & Partner, Arabellastrasse 4, D-81925 München (DE).				
(54) Title: DNA EXPRESSION VECTORS FOR USE IN THE TREATMENT OF VASCULAR DISEASES BY GENE THERAPY				
(54) Bezeichnung: DNA-EXPRESSIONSVEKTOREN ZUR VERWENDUNG IN DER GENTHERAPEUTISCHEN BEHANDLUNG VON GEFÄSSERKRANKUNGEN				
(57) Abstract <p>The invention concerns a DNA expression vector which is characterized in that it comprises a DNA sequence which codes for a protein having the biological activity of nitrogen monoxide synthase (NOS). The DNA expression vector also comprises eukaryotic regulation elements which bring about the expression of said DNA sequence in eukaryotic cells. The invention further concerns the use of the expression vector for treating or preventing vascular diseases.</p>				
(57) Zusammenfassung <p>Es wird ein DNA-Expressionsvektor beschrieben, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er eine DNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, das die biologische Aktivität von Stickstoff-monoxid-synthase (NOS) besitzt, und eukaryotische Regulations-Elemente umfasst, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Elemente die Expression der genannten DNA-Sequenz in eukaryotischen Zellen bewirken, sowie die Verwendung des Expressionsvektors zur Behandlung oder Verhinderung von Gefässerkrankungen.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Verinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**DNA-Expressionsvektoren zur Verwendung in der
gentherapeutischen Behandlung von Gefässerkrankungen**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Expressionsvektoren zur gentherapeutischen Behandlung von Gefässerkrankungen, wie Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose oder Restenose.

Unter der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) versteht man ein in der Klinik weit verbreitetes Verfahren bei dem die kritische Einengung eines Herzkranzgefäßes (Koronarstenose) über einen Katheter mechanisch aufgedehnt und damit wieder durchgängig gemacht wird. Die Achillesferse der PTCA ist bis zum heutigen Tag die Restenose. Diese tritt nach Wochen bis Monaten nach erfolgreicher PTCA in 12-43% aller behandelten Patienten auf (Lange R.A. et al, Southwestern Internal Medicine Conference: Restenosis: The achilles heal of coronary angioplasty, Am.J. Med. Sci 265-274, 1993). Eine erneute PTCA oder eine Bypass-Operation ist die notwendige Folge.

Der genaue Mechanismus der Restenose ist letztlich ungeklärt. Entscheidend ist aber der initiale mechanische Dehnungsreiz bei dem es neben der Zerstörung der Endothelzellen zu Rissen in den arteriosklerotischen Wandbezirken bei gleichzeitiger Ablagerung von Fibrin und Blutplättchen kommt. Die Blutplättchen setzen ihrerseits gefäßkonstriktorische und die Proliferation steigernde Stoffwechselprodukte frei, die die wachstumshemmenden Faktoren der glatten Gefäßmuskulatur überspielen. Eine

Hyperplasie der Muskelmedia, d.h. eine Restenose ist die Folge.

Verschiedene Strategien zur Verhinderung der Restenose wurden in der Vergangenheit in klinischen Studien untersucht. Was die pharmakologische Therapie betrifft, so hatte weder der Einsatz von antithrombotischen (Aspirin, Heparin), antispastischen (Nifedipin, Diltazem), antiproliferativen (Colchizin) Mitteln noch eine Lipidspiegel senkende Therapie einen günstigen Einfluss auf die Entwicklung der Restenose. Ebenso erbrachte die Entwicklung neuer Katheter (Laser-Angioplastie, Atherektomie Katheter) zur Minimalisierung des Gewebetraumas bei der PTCA keinen Erfolg bei der Verhinderung der Restenose.

Eine Therapie die Restenose gibt es z.Z. nicht. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Wirkspiegel im Blut nach systemischer Applikation eines Pharmakons zu gering sind, um lokal therapeutisch wirksam werden zu können.

Stickstoffmonoxid (NO) wird in Säugetierzellen aus der Aminosäure L-Arginin unter Vermittlung des Enzyms NO-Synthase (NOS) gebildet. NO ist ein wichtiger Botenstoff bzw. Signalmolekül im menschlichen Körper, das eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Wirkungen vermittelt. Im zentralen Nervensystem ist NO wahrscheinlich an der Regulation von integrativen Leistungen, d.h. Gedächtnisfunktionen beteiligt. Im Gastrointestinaltrakt vermutet man eine Beteiligung an der Darmperistaltik. Das von Makrophagen gebildete NO ist in der Lage, Bakterien und Parasiten abzutöten. Innerhalb des Herz-Kreislaufsystems wird NO von den Endothelzellen gebildet, wo es mindestens zwei wichtige Funktionen ausübt. Zur luminalen Seite des Gefäßes hin hemmt es die Plättchenaggregation und ist

damit für die antithrombogene Eigenschaft der Gefäßinnenwand mitverantwortlich. An der abluminalen Seite relaxiert NO die glatte Gefäßmuskulatur und übt langfristig einen proliferationshemmenden Effekt aus. Ein Wegfall des endothelialen NO, z.B. bei Schädigung des Blutgefäßendothels, führt am Gesamtorganismus zu einem Bluthochdruck und ist wahrscheinlich auch an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt. Für die Funktion von NO ist ausserdem wichtig, dass seine biologische Halbwertszeit kürzer als eine Sekunde ist. Somit kann NO lediglich die Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft vom Bildungsort erreichen, d.h. die Wirkung von NO ist lokal beschränkt.

Zur Familie der NOS gehören mindestens drei verschiedene NOS Isoenzyme: das endotheliale Enzym (eNOS), das Gehirn-Enzym (bNOS) und die induzierbare NOS (iNOS). Alle drei Isoenzyme sind inzwischen isoliert, ihre Primärstruktur, d.h. Aminosäuresequenz aufgeklärt und die kodierenden Genabschnitte charakterisiert. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen NOS liegt in ihrem Molekulargewicht und vor allem in der Regulation der Expression und der enzymatischen Aktivität. So werden die eNOS und bNOS über ihre Aktivität und die iNOS vorzugsweise über die Expression reguliert.

Zur Charakterisierung der NOS-Enzyme wird folgendes erläutert:

eNOS: Dieses Isoenzym hat ein Molekulargewicht von 133 kDa, hat eine Bindungsstelle für Calmodulin, die abhängig ist von der freien Ca^{++} -Konzentration und liegt zu mehr als 90% membrangebunden vor.

bNOS: das Hirn-Enzym ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 160 kDa pro Untereinheit, das zu

weniger als 10% membrangebunden vorliegt. Wie bei der eNOS ist die Calmodulin-Bindung abhängig vom freien Ca^{++} , d.h. beide Enzyme werden nur aktiv, wenn die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration, z.B. infolge eines rezeptorvermittelten Ca^{++} -Einstroms, erhöht ist.

iNOS: die induzierbare NOS ist ebenfalls ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 130 kDa pro Untereinheit. Der wesentliche Unterschied zu den anderen Isoenzymen ist, dass die Aktivität der iNOS unabhängig von Calmodulin und damit unabhängig vom zellulären Calcium ist. Weil die Umsatzgeschwindigkeit für L-Arginin für die iNOS etwa 10-100 mal höher ist als bei der eNOS oder bNOS, wird die iNOS auch als "high output" NOS bezeichnet. Die iNOS lässt sich unter basalen Bedingungen normalerweise nicht nachweisen; sie wird jedoch nach immunologischer Aktivierung durch Entzündungsmediatoren und Endotoxine stark exprimiert.

Aufgabe der Erfindung ist es, einen Expressionsvektor zur Verfügung zu stellen, welcher geeignet ist, zur gentherapeutischen Behandlung von Gefässerkrankungen, insbesondere Bluthochdruck oder Arteriosklerose, Stenose oder Restenose.

Die vorstehende Aufgabe wird gelöst durch einen DNA-Expressionsvektor, der aus einer DNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, das die biologische Aktivität von Stickstoff-monoxid-synthase beinhaltet, und aus eukaryotischen Regulations-Elementen besteht, wobei die mit diesem DNA-Expressionsvektor transformierten oder infizierten Blutgefäße rekombinante Stickstoff-monoxid-synthase in einer therapeutisch annehmbaren Menge zur Hemmung von Stenose oder Restenose der genannten

Blutgefäße und/oder zur Hemmung der Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur exprimieren.

Der vorstehende Expressionsvektor findet gemäss der Erfindung Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Gefässerkrankungen, insbesondere Bluthochdruck, Arteriosklerose oder Stenose, und insbesondere für Restenose der koronaren Herzkranzgefäße nach perkutaner, transluminaler koronarer Angioplastie.

Im weiteren wird eine pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verfügung gestellt.

Die Erfinder haben überraschenderweise gefunden, dass die Expression von rekombinanter Stickstoff-monoxid-synthase in Blutgefäßen, die mit einem hier beschriebenen DNA-Expressionsvektor transfiziert wurden, zu einer therapeutisch relevanten Hemmung der Gefäß-Stenose und Restenose nach perkutaner, transluminaler, koronarer Angioplastie führt.

Die Erfindung bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, vorzugsweise eine cDNA-Sequenz, die erhalten wird von Säugern, vorzugsweise von Mäusen oder Menschen, welche für iNOS-, bNOS- oder eNOS-, vorzugsweise iNOS-Aktivität codiert. Bevorzugt wird die iNOS cDNA eingesetzt, da sie eine höhere spezifische Aktivität hat, die darüber hinaus Ca-unabhängig ist. Die Enzymaktivität ist daher unabhängig von regulatorischen Einflüssen.

Der DNA-Expressionsvektor kann ein Sequenzelement, das die Replikation in Bakterien ermöglicht, ein Sequenzelement, das die Replikation des genannten Vektors in eukaryotischen Zellen ermöglicht, vorzugsweise das SV40 Replikations-

Sequenzelement, ein Polyadenylierungs-Signal und ein oder mehrere Introns umfassen.

Das Regulationselement kann den Promotor und/oder die Enhancer-Region von eukaryotischen Viren, vorzugsweise von Cytomegalovirus oder Adenovirus, und mehr bevorzugt den Promotor-Enhancer des Cytomegalovirus Immediate-Early Polypeptid-Gens, umfassen.

Ausserdem bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Behandlung und Verhinderung von Gefässerkrankungen beim Menschen, wie Bluthochdruck und Arteriosklerose sowie Stenose oder Restenose der Blutgefässe. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung und Vorbeugung von Restenose der Herzgefässe nach perkutaner, transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA), wobei die Blutgefässe mit dem oben beschriebenen DNA-Expressionsvektor in Kontakt gebracht, transfiziert oder infiziert werden .

Die Transfizierung oder Infizierung der Blutgefässe mit einem DNA-Expressionsvektor kann durch jede im Stand der Technik bekannte Standardmethode erfolgen und ist nicht auf die hier beschriebene Transfizierungstechnik beschränkt.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die diesen DNA-Expressionsvektor zur Behandlung oder Verhinderung der oben genannten Gefässerkrankungen umfasst. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zusätzlich zu dem DNA-Expressionsvektor einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, ein Stabilisierungsmittel oder Puffer umfassen.

Die nachfolgenden Figuren dienen der Erläuterung der Erfindung.

- Fig.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenz der induzierbaren NO-Synthase der Maus (*Mus musculus/Mammalia*) abgeleitet aus der clonierten cDNA, Genbank Accession No.: M92649);
- Fig.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenz der neuronalen NO-Synthase des Menschen (*Homo sapiens/Mammalia*) aus der clonierten cDNA, Genbank Accession No.:L02881);
- Fig.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenz der endothelialen NO-Synthase des Rindes (*Bos taurus/Mammalia*) abgeleitet aus der clonierten cDNA, Genbank Accession No.: M95674;
- Fig.4a das 2,17 Kb CMV-Promotor enthaltende PvuI-PvuII-Fragment, das zum weiteren Aufbau des Plasmids pSCMV aus dem Plasmid pSP65h-CMV isoliert wurde;
- Fig.4b das die 2,80 Kb 3'-Region des β -Globin-Gens und den SV40 Replikationsursprung enthaltende PvuI-PvuII-Fragment, das zum weiteren Aufbau des Plasmids pCMV aus dem Plasmid pSCT GAL X-556 isoliert wurde;
- Fig.4c das Plasmid pSCMV;
- Fig.4d das 3,97Kb iNOS-enthaltende HindIII-XhoI-Fragment gemäss Fig. 1;
- Fig.4e das Plasmid pSCMV-iNOS.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie jedoch darauf zu beschränken.

Beispiel 1

I. Elemente eines Expressionsvektors

Das Expressionsplasmid pSCMV-iNOS wurde auf der Basis des Plasmids pS065 (Promega Biotech) cloniert. Es enthält die folgenden funktionellen Elemente:

- Promotor/Enhancer des humanen Cytomegalovirus Immediate-Early-Polypeptids (Pos. 216-809 /Genbank Accession No.: K03104)
- cDNA der induzierbaren NO-Synthase der Maus (Pos. 127-4110/Genbank Accession No.: M92649)
- genomische Sequenzen des ss-Globin-Gens des Kaninchens (Pos. 905-2080), die das Intron 2, das Exon 3 und das Polyadenylierungssignal enthalten (Pos. 905-1827 sind unter Genbank Accession No.: J00659 abgespeichert).
- den Replikationsursprung des SV40-Virus (Pos. 130 [SV40 early map] bzw. Pos. 5176- 130 der zirkulären SV40 Karte/Genbank Accession No.: V01380).

II. Herstellung eines Expressionsvektors:

Der CMV-Promotor/Enhancer lag als DNA-Fragment mit stumpfen Enden in die SmaI-Stelle des Plasmids pSP65 inseriert vor (pSP65 h-CMV1) Aus diesem Plasmid wurde das PvuI-PvuII-Fragment isoliert (Fig.4a), das den CMV-Promotor trägt.

Aus dem Plasmid PSCT GAL.X-556 (siehe Fig. 4b) wurde ein PvuII-PvuI-Fragment isoliert, das die 3'-Region des ss-Globin-Gens und den SV40 Replikationsursprung trägt (Fig.4b). Dieses Fragment wurde mit dem PvuII-PvuI-Fragment

aus pSP65h-CMV1 ligiert. An dem resultierenden Plasmid (pSCMV, Fig. 4c) wurden folgende Veränderungen vorgenommen:

- Deletion der Vektorsequenzen zwischen HindIII und PvuII bei gleichzeitiger Insertion eines ClaI-Linkers. Dadurch gehen die Ausgangsschnittstellen PvuII und HindIII verloren.
- Umwandlung der XhoI-Schnittstelle in eine PvuI-Schnittstelle.

Der erhaltene Vektor wurde als pSCMV2 bezeichnet.

Die iNOS-cDNA wurde als HindIII-XhoI-Fragment (Fig.4d) in den XbaI-SaII verdauten Vektor pSCMV2 cloniert. Dazu wurden die 5'-überhängenden Enden nach der XbaI-Verdauung durch Auffüllen in glatte Enden umgewandelt. Am 3'-Ende wurde die cDNA mit dem Intron und dem Polyadenylierungssignal des ss-Globin-Gens aus dem Huhn fusioniert. Die Funktionalität des Konstrukts wurde durch Transfektion von COS-Zellen und anschliessendem Nachweis der Enzymaktivität überprüft. Das resultierende Plasmid pSCMV-iNOS (Fig.4e) wurde für die Transfektionsexperimente eingesetzt. Der CMV-Promotor vermittelt eine konstitutive Expression des iNOS-Gens. Die Aktivität des gebildeten Enzyms ist Ca-unabhängig.

III. Herstellung von DNA-Liposomenkomplexen

Die Anzucht von Sendai-Viren erfolgte in der Chorion-allantis-Flüssigkeit befruchteter Hühnereier (dl0-dl2 der Embryonalentwicklung) nach Standardverfahren (Nakanishi M., Uchida T., Sugawa H., Ishiura M., Okada Y., Exp. Cell. Res. 159, 399-409).

Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Cholesterin wurden in Tetrahydrofuran gelöst, im molaren Verhältnis von 4.8:1:2 gemischt und unter Stickstoff evaporiert. 10 mg der getrockneten Lipide wurden durch Vortexen in 200 µl pSCMV-iNOS [gelöst in BSS (140 mM NaCl, 5.4 mM KCl und 10 mM Tris-HCl, pH7.69)] (Konz. 1 µg/µl) suspendiert. Die erhaltenen Liposomen wurden mit 4 ml Sendai-Virus (Z-Stamm) (16000 Hämagglutinations-Einheiten (HAU)/ml) 3h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschliessend für 20" im Ultraschallbad beschallt. Die Viren wurden vor der Verwendung mit UV-Licht inaktiviert ($11 \text{ J/m}^2 \times \text{s}$). Die erhaltene Suspension wurde auf zwei Saccharose-Gradienten (1 ml 60%, 1 ml 40%, 8 ml 30% Saccharose in BSS) geladen und für 3 h bei 30.000 UpM im SW40-Rotor (Beckman Instruments) bei 4°C zentrifugiert. Die oberen 2 ml wurden abgenommen und für die Transfektionsexperimente eingesetzt.

IV. Transfektions-Protokoll

Zur Untersuchung des Effekts einer lokalen Überexpression der iNOS auf die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur nach Endothelschädigung in vivo wurde das von Clowes AW, Reidy MA und Clowes (MM Lab. Invest 49, 327-333, 1983) etablierte Restenose-Modell der Ratte benutzt. Im Bereich des Halses wurde die Arteria carotis communis dargestellt sowie die rostral gelegene Bifurkation, an der sich die A. carotis communis in die A. carotis externa und A. carotis interna aufspaltet. Die A. carotis externa wurde etwa 1 cm rostral von der Bifurkation permanent, die A. carotis interna durch eine Gefässklemme vorübergehend unterbunden. Die A. carotis externa wurde durch einen Schnitt etwa 0.5 cm rostral von der Bifurkation geöffnet. Über diese Öffnung wurde ein Fogarty 2F Embolektomie-Katheter in die A. carotis communis eingeführt, und das Endothel der A.

carotis communis wurde durch drei Passagen des dilatierten Katheters entfernt.

Für die "Therapiegruppe" wurde das folgende Verfahren angewendet. Das denudierte Gefäss wurde nach Entfernen des Katheters 1.5 bis 2 cm caudal von der Bifurkation mit einer Gefässklemme verschlossen. Von der Öffnung in der A. carotis externa wurde ein Polyethylen-Katheter in das Gefäss eingebunden. Über diesen Katheter wurden 50-100 µl einer Lösung mit DNA-Liposomen-Komplexen innerhalb 15-20 min. in den isolierten Abschnitt der A. carotis communis injiziert. Es wurde darauf geachtet, dass der Gefässabschnitt während der Transfektion durch die Liposomenlösung unter Druck stand. Nach Entfernen des Transfektionkatheters wurde die A. carotis externa caudal des Gefässschnittes permanent unterbunden und anschliessend der Blutfluss durch Entfernen der Gefässklemmen über die A. carotis communis und A. carotis interna wieder hergestellt.

V. Morphologische Analyse der Gefässe

Ratten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (bis 21d) nach Transfektion der A. carotis communis auf die morphologischen Veränderungen in den Gefässen hin untersucht. Die Gefässe wurden durch Perfusion mit 3% Paraformaldehyd in PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat, pH 7.5) fixiert und geschnitten. Das Ausmass der Proliferation wurde mit kontrollbehandelten Gefässen verglichen. Es zeigte sich eine Reduktion der Stenose-Bildung um bis zu 60% bei den behandelten Tieren. Diese Studie zeigt erstmals, dass in diesem Tiermodell die lokale Überexpression eines Gens eine therapierrelevante Hemmung der Gefässstenose zur Folge hat und demonstriert die besondere Rolle von NO für die Hemmung der Proliferation der glatten Gefässmuskulatur.

Patentansprüche

1. DNA-Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, dass er eine DNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, das die biologische Aktivität von Stickstoff-monoxid-synthase (NOS) besitzt, und eukaryotische Regulations-Elemente umfasst, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Expressions-Elemente die Expression der genannten DNA-Sequenz in eukaryotischen Zellen bewirken.
2. DNA-Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, dass er eine cDNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, das die biologische Aktivität von Stickstoff-monoxid-synthase (NOS) besitzt, und eukaryotische Regulations-Elemente umfasst, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Expressions-Elemente die Expression der genannten cDNA-Sequenz in eukaryotischen Zellen bewirken.
3. DNA-Expressionsvektor nach Anspruch 1 oder 2, wobei die genannte DNA- oder cDNA-Sequenz von Säugern abgeleitet ist.
4. DNA-Expressionsvektor nach Anspruch 3, wobei die DNA- oder cDNA-Sequenz eine humane DNA- oder cDNA-Sequenz darstellt.
5. DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorangehenden Ansprüche, wobei die cDNA die Nukleotidsequenz von Stickstoff-monoxid-synthase gemäss Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 umfasst, oder die Aminosäuresequenz von Stickstoff-monoxid-synthase gemäss Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 codiert.

6. DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorangehenden Ansprüche, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Elemente von einem eukaryotischen Virus abgeleitet sind.
7. DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorangehenden Ansprüche, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Elemente von dem Cytomegalovirus (CMV)-Promotor und/oder Enhancer der frühen Gene abgeleitet ist.
8. DNA-Expressionsvektor nach Anspruch 6, wobei der genannte DNA-Expressionsvektor pSCMV-iNOS gemäss Fig. 4e darstellt.
9. DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Elemente von einem Adenovirus-Promotor und/oder -Enhancer-Element abgeleitet sind.
10. Pharmazeutisches Mittel, dadurch gekennzeichnet, dass es einen DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.
11. Verwendung des DNA-Expressionsvektors nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 bzw. des pharmazeutischen Mittels nach Anspruch 10 zur Behandlung oder Verhinderung von Gefässerkrankungen, Bluthochdruck oder Arteriosklerose, Stenose oder Restenose der Blutgefässe.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei es sich bei der Restenose um eine Restenose der Herzkranzgefässe nach

perkutaner transluminaler Koronar-Angioplastie (PTCA)
handelt.

1/23
Figur. 1

GAGACTCTGG	CCCCACGGGA	CACAGTGTCA	CTGGTTTGAA	ACTTCTCAGC	CACCTTGGTG	60
AAGGGACTGA	GCTGTTAGAG	ACACTTCTGA	GGCTCCTCAC	GCTTGGGTCT	TGTTCACTCC	120
ACGGAGTAGC	CTAGTCAACT	GCAAGAGAAC	GGAGAACGTT	GGATTGGAG	CAGAAGTGCA	180
AAGTCTCAGA	C ATG GCT TGC CCC TGG AAG TTT CTC TTC AAA GTC AAA TCC	Met Ala Cys Pro Trp Lys Phe Leu Phe Lys Val Lys Ser	1	5	10	230
TAC CAA AGT GAC CTG AAA GAG GAA AAG GAC ATT AAC AAC AAC GTG AAG	Tyr Gln Ser Asp Leu Lys Glu Glu Lys Asp Ile Asn Asn Asn Val Lys	15	20	25		278
AAA ACC CCT TGT GCT GTT CTC AGC CCA ACA ATA CAA GAT GAC CCT AAG	Lys Thr Pro Cys Ala Val Leu Ser Pro Thr Ile Gln Asp Asp Pro Lys	30	35	40	45	326
AGT CAC CAA AAT GGC TCC CCG CAG CTC CTC ACT GGG ACA GCA CAG AAT	Ser His Gln Asn Gly Ser Pro Gln Leu Leu Thr Gly Thr Ala Gln Asn	50	55	60		374
GTT CCA GAA TCC CTG GAC AAG CTG CAT GTG ACA TCG ACC CGT CCA CAG	Val Pro Glu Ser Leu Asp Lys Leu His Val Thr Ser Thr Arg Pro Gln	65	70	75		422
TAT GTG AGG ATC AAA AAC TGG GGC AGT GGA GAG ATT TTG CAT GAC ACT	Tyr Val Arg Ile Lys Asn Trp Gly Ser Gly Glu Ile Leu His Asp Thr	80	85	90		470
CTT CAC CAC AAG GCC ACA TCG GAT TTC ACT TGC AAG TCC AAG TCT TGC	Leu His His Lys Ala Thr Ser Asp Phe Thr Cys Lys Ser Lys Ser Cys	95	100	105		518
TTG GGG TCC ATC ATG AAC CCC AAG AGT TTG ACC AGA GGA CCC AGA GAC	Leu Gly Ser Ile Met Asn Pro Lys Ser Leu Thr Arg Gly Pro Arg Asp	110	115	120	125	566
AAG CCT ACC CCT CTG GAG GAG CTC CTG CCT CAT GCC ATT GAG TTC ATC	Lys Pro Thr Pro Leu Glu Glu Leu Leu Pro His Ala Ile Glu Phe Ile	130	135	140		614
AAC CAG TAT TAT GGC TCC TTT AAA GAG GCA AAA ATA GAG GAA CAT CTG	Asn Gln Tyr Tyr Gly Ser Phe Lys Glu Ala Lys Ile Glu Glu His Leu	145	150	155		662
GCC AGG CTG GAA GCT GTA ACA AAG GAA ATA GAA ACA ACA GGA ACC TAC	Ala Arg Leu Glu Ala Val Thr Lys Glu Ile Glu Thr Thr Gly Thr Tyr	160	165	170		710
CAG CTC ACT CTG GAT GAG CTC ATC TTT GCC ACC AAG ATG GCC TGG AGG	Gln Leu Thr Leu Asp Glu Leu Ile Phe Ala Thr Lys Met Ala Trp Arg	175	180	185		758
AAT GCC CCT CGC TGC ATC GGC AGG ATC CAG TGG TCC AAC CTG CAG GTC	Asn Ala Pro Arg Cys Ile Gly Arg Ile Gln Trp Ser Asn Leu Gln Val	190	195	200	205	806
TTT GAC GCT CGG AAC TGT AGC ACA GCA CAG GAA ATG TTT CAG CAC ATC	Phe Asp Ala Arg Asn Cys Ser Thr Ala Gln Glu Met Phe Gln His Ile	210	215	220		854

TGC AGA CAC ATA CTT TAT GCC ACC AAC AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC Cys Arg His Ile Leu Tyr Ala Thr Asn Asn Gly Asn Ile Arg Ser Ala 225 230 235	902
ATC ACT GTG TTC CCC CAG CGG AGT GAC GGC AAA CAT GAC TTC AGG CTC Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Ser Asp Gly Lys His Asp Phe Arg Leu 240 245 250	950
TGG AAT TCA CAG CTC ATC CGG TAC GCT GGC TAC CAG ATG CCC GAT GGC Trp Asn Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Ala Gly Tyr Gln Met Pro Asp Gly 255 260 265	998
ACC ATC AGA GGG GAT GCT GCC ACC TTG GAG TTC ACC CAG TTG TGC ATC Thr Ile Arg Gly Asp Ala Ala Thr Leu Glu Phe Thr Gln Leu Cys Ile 270 275 280 285	1046
GAC CTA GGC TGG AAG CCC CGC TAT GGC CGC TTT GAT GTG CTG CCT CTG Asp Leu Gly Trp Lys Pro Arg Tyr Gly Arg Phe Asp Val Leu Pro Leu 290 295 300	1094
GTC TTG CAA GCT GAT GGT CAA GAT CCA GAG GTC TTT GAA ATC CCT CCT Val Leu Gln Ala Asp Gly Gln Asp Pro Glu Val Phe Glu Ile Pro Pro 305 310 315	1142
GAT CTT GTG TTG GAG GTG ACC ATG GAG CAT CCC AAG TAC GAG TGG TTC Asp Leu Val Leu Glu Val Thr Met Glu His Pro Lys Tyr Glu Trp Phe 320 325 330	1190
CAG GAG CTC GGG TTG AAG TGG TAT GCA CTG CCT GCC GTG GCC AAC ATG Gln Glu Leu Gly Leu Lys Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val Ala Asn Met 335 340 345	1238
CTA CTG GAG GTG GGT GGC CTC GAA TTC CCA GCC TGC CCC TTC AAT GGT Leu Leu Glu Val Gly Leu Glu Phe Pro Ala Cys Pro Phe Asn Gly 350 355 360 365	1286
TGG TAC ATG GGC ACC GAG ATT GGA GTT CGA GAC TTC TGT GAC ACA CAG Trp Tyr Met Gly Thr Glu Ile Gly Val Arg Asp Phe Cys Asp Thr Gln 370 375 380	1334
CGC TAC AAC ATC CTG GAG GAA GTG GGC CGA AGG ATG GGC CTG GAG ACC Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Glu Val Gly Arg Arg Met Gly Leu Glu Thr 385 390 395	1382
CAC ACA CTG GCC TCC CTC TGG AAA GAC CGG GCT GTC ACG GAG ATC AAT His Thr Leu Ala Ser Leu Trp Lys Asp Arg Ala Val Thr Glu Ile Asn 400 405 410	1430
GTG GCT GTG CTC CAT AGT TTC CAG AAG CAG AAT GTG ACC ATC ATG GAC Val Ala Val Leu His Ser Phe Gln Lys Gln Asn Val Thr Ile Met Asp 415 420 425	1478
CAC CAC ACA GCC TCA GAG TCC TTC ATG AAG CAC ATG CAG AAT GAG TAC His His Thr Ala Ser Glu Ser Phe Met Lys His Met Gln Asn Glu Tyr 430 435 440 445	1526
CGG GCC CGT GGA GGC TGC CCG GCA GAC TGG ATT TGG CTG GTC CCT CCA Arg Ala Arg Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ile Trp Leu Val Pro Pro 450 455 460	1574
GTG TCT GGG AGC ATC ACC CCT GTG TTC CAC CAG GAG ATG TTG AAC TAT Val Ser Gly Ser Ile Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Leu Asn Tyr 465 470 475	1622

3/23

GTC CTA TCT CCA TTC TAC TAC TAC CAG ATC GAG CCC TGG AAG ACC CAC Val Leu Ser Pro Phe Tyr Tyr Tyr Gln Ile Glu Pro Trp Lys Thr His 480 485 490	1670
ATC TGG CAG AAT GAG AAG CTG AGG CCC AGG AGG AGA GAG ATC CGA TTT Ile Trp Gln Asn Glu Lys Leu Arg Pro Arg Arg Arg Glu Ile Arg Phe 495 500 505	1718
AGA GTC TTG GTG AAA GTG GTG TTC TTT GCT TCC ATG CTA ATG CGA AAG Arg Val Leu Val Lys Val Val Phe Phe Ala Ser Met Leu Met Arg Lys 510 515 520 525	1766
GTC ATG GCT TCA CGG GTC AGA GCC ACA GTC CTC TTT GCT ACT GAG ACA Val Met Ala Ser Arg Val Arg Ala Thr Val Leu Phe Ala Thr Glu Thr 530 535 540	1814
GGG AAG TCT GAA GCA CTA GCC AGG GAC CTG GCC ACC TTG TTC AGC TAC Gly Lys Ser Glu Ala Leu Ala Arg Asp Leu Ala Thr Leu Phe Ser Tyr 545 550 555	1862
GCC TTC AAC ACC AAG GTT GTC TGC ATG GAC CAG TAT AAG GCA AGC ACC Ala Phe Asn Thr Lys Val Val Cys Met Asp Gln Tyr Lys Ala Ser Thr 560 565 570	1910
TTG GAA GAG GAG CAA CTA CTG CTG GTG GTG ACA AGC ACA TTT GGG AAT Leu Glu Glu Glu Gln Leu Leu Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn 575 580 585	1958
GGA GAC TGT CCC AGC AAT GGG CAG ACT CTG AAG AAA TCT CTG TTC ATG Gly Asp Cys Pro Ser Asn Gly Gln Thr Leu Lys Lys Ser Leu Phe Met 590 595 600 605	2006
CTT AGA GAA CTC AAC CAC ACC TTC AGG TAT GCT GTG TTT GGC CTT GGC Leu Arg Glu Leu Asn His Thr Phe Arg Tyr Ala Val Phe Gly Leu Gly 610 615 620	2054
TCC AGC ATG TAC CCT CAG TTC TGC GCC TTT GCT CAT GAC ATC GAC CAG Ser Ser Met Tyr Pro Gln Phe Cys Ala Phe Ala His Asp Ile Asp Gln 625 630 635	2102
AAG CTG TCC CAC CTG GGA GCC TCT CAG CTT GCC CCA ACA GGA GAA GGG Lys Leu Ser His Leu Gly Ala Ser Gln Leu Ala Pro Thr Gly Glu Gly 640 645 650	2150
GAC GAA CTC AGT GGG CAG GAG GAT GCC TTC CGC AGC TGG GCT GTA CAA Asp Glu Leu Ser Gly Gln Glu Asp Ala Phe Arg Ser Trp Ala Val Gln 655 660 665	2198
ACC TTC CGG GCA GCC TGT GAG ACC TTT GAT GTC CGA AGC AAA CAT CAC Thr Phe Arg Ala Ala Cys Glu Thr Phe Asp Val Arg Ser Lys His His 670 675 680 685	2246
ATT CAG ATC CCG AAA CGC TTC ACT TCC AAT GCA ACA TGG GAG CCA CAG Ile Gln Ile Pro Lys Arg Phe Thr Ser Asn Ala Thr Trp Glu Pro Gln 690 695 700	2294
CAA TAT AGG CTC ATC CAG AGC CCG GAG CCT TTA GAC CTC AAC AGA GCC Gln Tyr Arg Leu Ile Gln Ser Pro Glu Pro Leu Asp Leu Asn Arg Ala 705 710 715	2342

CTC AGC AGC ATC CAT GCA AAG AAC GTG TTT ACC ATG AGG CTG AAA TCC Leu Ser Ser Ile His Ala Lys Asn Val Phe Thr Met Arg Leu Lys Ser 720 725 730	2390
CAG CAG AAT CTG CAG AGT GAA AAG TCC AGC CGC ACC ACC CTC CTC GTT Gln Gln Asn Leu Gln Ser Glu Lys Ser Ser Arg Thr Thr Leu Leu Val 735 740 745	2438
CAG CTC ACC TTC GAG GGC AGC CGA GGG CCC AGC TAC CTG CCT GGG GAA Gln Leu Thr Phe Glu Gly Ser Arg Gly Pro Ser Tyr Leu Pro Gly Glu 750 755 760 765	2486
CAC CTG GGG ATC TTC CCA GGC AAC CAG ACC GCC CTG GTG CAG GGA ATC His Leu Gly Ile Phe Pro Gly Asn Gln Thr Ala Leu Val Gln Gly Ile 770 775 780	2534
TTG GAG CGA GTT GTG GAT TGT CCT ACA CCA CAC CAA ACT GTG TGC CTG Leu Glu Arg Val Val Asp Cys Pro Thr Pro His Gln Thr Val Cys Leu 785 790 795	2582
GAG GTT CTG GAT GAG AGC GGC AGC TAC TGG GTC AAA GAC AAG AGG CTG Glu Val Leu Asp Glu Ser Gly Ser Tyr Trp Val Lys Asp Lys Arg Leu 800 805 810	2630
CCC CCC TGC TCA CTC AGC CAA GCC CTC ACC TAC TTC CTG GAC ATT ACG Pro Pro Cys Ser Leu Ser Gln Ala Leu Thr Tyr Phe Leu Asp Ile Thr 815 820 825	2678
ACC CCT CCC ACC CAG CTG CAG CTC CAC AAG CTG GCT CGC TTT GCC ACG Thr Pro Pro Thr Gln Leu Gln Leu His Lys Leu Ala Arg Phe Ala Thr 830 835 840 845	2726
GAC GAG ACG GAT AGG CAG AGA TTG GAG GCC TTG TGT CAG CCC TCA GAG Asp Glu Thr Asp Arg Gln Arg Leu Glu Ala Leu Cys Gln Pro Ser Glu 850 855 860	2774
TAC AAT GAC TGG AAG TTC AGC AAC AAC CCC ACG TTC CTG GAG GTG CTT Tyr Asn Asp Trp Lys Phe Ser Asn Asn Pro Thr Phe Leu Glu Val Leu 865 870 875	2822
GAA GAG TTC CCT TCC TTG CAT GTG CCC GCT GCC TTC CTG CTG TCG CAG Glu Glu Phe Pro Ser Leu His Val Pro Ala Ala Phe Leu Leu Ser Gln 880 885 890	2870
CTC CCT ATC TTG AAG CCC CGC TAC TAC TCC ATC AGC TCC TCC CAG GAC Leu Pro Ile Leu Lys Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Gln Asp 895 900 905	2918
CAC ACC CCC TCG GAG GTT CAC CTC ACT GTG GCC GTG GTC ACC TAC CGC His Thr Pro Ser Glu Val His Leu Thr Val Ala Val Val Thr Tyr Arg 910 915 920 925	2966
ACC CGA GAT GGT CAG GGT CCC CTG CAC CAT GGT GTC TGC AGC ACT TGG Thr Arg Asp Gly Gln Gly Pro Leu His His Gly Val Cys Ser Thr Trp 930 935 940	3014
ATC AGG AAC CTG AAG CCC CAG GAC CCA GTG CCC TGC TTT GTG CGA AGT Ile Arg Asn Leu Lys Pro Gln Asp Pro Val Pro Cys Phe Val Arg Ser 945 950 955	3062
GTC AGT GGC TTC CAG CTC CCT GAG GAC CCC TCC CAG CCT TGC ATC CTC Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Glu Asp Pro Ser Gln Pro Cys Ile Leu 960 965 970	3110

5/23

ATT GGG CCT GGT ACG GGC ATT GCT CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG Ile Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Ser Phe Trp Gln Gln 975 980 985	3158
CGG CTC CAT GAC TCC CAG CAC AAA GGG CTC AAA GGA GGC CGC ATG AGC Arg Leu His Asp Ser Gln His Lys Gly Leu Lys Gly Gly Arg Met Ser 990 995 1000 1005	3206
TTG GTG TTT GGG TGC CGG CAC CCG GAG GAG GAC CAC CTC TAT CAG GAA Leu Val Phe Gly Cys Arg His Pro Glu Glu Asp His Leu Tyr Gln Glu 1010 1015 1020	3254
GAA ATG CAG GAG ATG GTC CGC AAG AGA GTG CTG TTC CAG GTG CAC ACA Glu Met Gln Glu Met Val Arg Lys Arg Val Leu Phe Gln Val His Thr 1025 1030 1035	3302
GGC TAC TCC CGG CTG CCC GGC AAA CCC AAG GTC TAC GTT CAG GAC ATC Gly Tyr Ser Arg Leu Pro Gly Lys Pro Lys Val Tyr Val Gln Asp Ile 1040 1045 1050	3350
GTG CAA AAG CAG CTG GCC AAT GAG GTA CTC AGC GTG CTC CAC GGG GAG Leu Gln Lys Gln Leu Ala Asn Glu Val Leu Ser Val Leu His Gly Glu 1055 1060 1065	3398
CAG GGC CAC CTC TAC ATT TGC GGA GAT GTG CGC ATG GCT CGG GAT GTG Gln Gly His Leu Tyr Ile Cys Gly Asp Val Arg Met Ala Arg Asp Val 1070 1075 1080 1085	3446
GCT ACC ACA TTG AAG AAG CTG GTG GCC ACC AAG CTG AAC TTG AGC GAG Ala Thr Thr Leu Lys Lys Leu Val Ala Thr Lys Leu Asn Leu Ser Glu 1090 1095 1100	3494
GAG CAG GTG GAA GAC TAT TTC TTC CAG CTC AAG AGC CAG AAA CGT TAT Glu Gln Val Glu Asp Tyr Phe Phe Gln Leu Lys Ser Gln Lys Arg Tyr 1105 1110 1115	3542
CAT GAA GAT ATC TTC GGT GCA GTC TTT TCC TAT GGG GCA AAA AAG GGC His Glu Asp Ile Phe Gly Ala Val Phe Ser Tyr Gly Ala Lys Lys Gly 1120 1125 1130	3590
AGC GCC TTG GAG GAG CCC AAA GCC ACG AGG CTC TGACAGCCCA GAGTTCCAGC Ser Ala Leu Glu Glu Pro Lys Ala Thr Arg Leu 1135 1140	3643
TTCTGGCACT GAGTAAAGAT AATGGTGAGG GGCTTGGGGA GACAGCGAAA TGCAATCCCC	3703
CCCAAGCCCC TCATGTCATT CCCCCCTCCT CCACCCTACC AAGTAGTATT GTATTATTGT	3763
GGACTACTAA ATCTCTCTCC TCTCCTCCCT CCCCTCTCTC CCTTTCCTCC CTTCTTCTCC	3823
ACTCCCCAGC TCCCTCCTTC TCCTTCTCCT CTTTGGCCTC TCACTCTTCC TTGGAGCTGA	3883
GAGCAGAGAA AAACTCAACC TCCTGACTGA AGCACTTTGG GTCACCACCA GGAGGCACCA	3943
TGCCGCCGCT CTAATACTTA GCTGCACTAT GTACAGATAT TTATACTTCA TATTTAAGAA	4003
AACAGATACT TTTGTCTACT CCCAATGATG GCTTGGGCCT TTCCTGTATA ATTCCTTGAT	4063
GAAAAATATT TATATAAAAT ACATTTTATT TTAATCAAAA AAAAAAA	4110

6/23

Figur 2

GAGCGGACGG GCTCATGATG CCTCAGATCT GATCCGCATC TAACAGGCTG GCAATGAAGA	60
TACCCAGAGA ATAGTTCACA TCTATCATGC GTCACCTTCTA GACACAGCCA TCAGACGCAT	120
CTCCTCCCCTT TTCTGCCTGA CCTTAGGACA CGTCCCACCG CCTCTCTTGA CGTCTGCCTG	180
GTCAACCATC ACTTCCTTAG AGAATAAGGA GAGAGGCGGA TGCAGGAAAT CATGCCACCG	240
ACGGGGCCACC AGCCATGAGT GGGTGACGCT GAGCTGACGT CAAAGACAGA GAGGGCTGAA	300
GCCTTGTCAG CACCTGTAC CCCGGCTCCT GCTCTCCGTG TAGCCTGAAG CCTGGATCCT	360
CCTGGTGAAA TCATCTTGGC CTGATAGCAT TGTGAGGTCT TCAGACAGGA CCCCTCGGAA	420
GCTAGTTACC ATG GAG GAT CAC ATG TTC GGT GTT CAG CAA ATC CAG CCC	469
Met Glu Asp His Met Phe Gly Val Gln Gln Ile Gln Pro	
1145 1150 1155	
AAT GTC ATT TCT GTT CGT CTC TTC AAG CGC AAA GTT GGG GGC CTG GGA	517
Asn Val Ile Ser Val Arg Leu Phe Lys Arg Lys Val Gly Gly Leu Gly	
1160 1165 1170	
TTT CTG GTG AAG GAG CGG GTC AGT AAG CCG CCC GTG ATC ATC TCT GAC	565
Phe Leu Val Lys Glu Arg Val Ser Lys Pro Pro Val Ile Ile Ser Asp	
1175 1180 1185	
CTG ATT CGT GGG GGC GCC GCA GAG CAG AGT GGC CTC ATC CAG GCC GGA	613
Leu Ile Arg Gly Gly Ala Ala Glu Gln Ser Gly Leu Ile Gln Ala Gly	
1190 1195 1200 1205	
GAC ATC ATT CTT GCG GTC AAC GGC CGG CCC TTG GTG GAC CTG AGC TAT	661
Asp Ile Ile Leu Ala Val Asn Gly Arg Pro Leu Val Asp Leu Ser Tyr	
1210 1215 1220	
GAC AGC GCC CTG GAG GTA CTC AGA GGC ATT GCC TCT GAG ACC CAC GTG	709
Asp Ser Ala Leu Glu Val Leu Arg Gly Ile Ala Ser Glu Thr His Val	
1225 1230 1235	
GTC CTC ATT CTG AGG GGC CCT GAA GGT TTC ACC ACG CAC CTG GAG ACC	757
Val Leu Ile Leu Arg Gly Pro Glu Gly Phe Thr Thr His Leu Glu Thr	
1240 1245 1250	
ACC TTT ACA GGT GAT GGG ACC CCC AAG ACC ATC CGG GTG ACA CAG CCC	805
Thr Phe Thr Gly Asp Gly Thr Pro Lys Thr Ile Arg Val Thr Gln Pro	
1255 1260 1265	
CTG GGT CCC CCC ACC AAA GCC GTG GAT CTG TCC CAC CAG CCA CCG GCC	853
Leu Gly Pro Pro Thr Lys Ala Val Asp Leu Ser His Gln Pro Pro Ala	
1270 1275 1280 1285	
GGC AAA GAA CAG CCC CTG GCA GTG GAT GGG GCC TCG GGT CCC GGG AAT	901
Gly Lys Glu Gln Pro Leu Ala Val Asp Gly Ala Ser Gly Pro Gly Asn	
1290 1295 1300	
GGG CCT CAG CAT GCC TAC GAT GAT GGG CAG GAG GCT GGC TCA CTC CCC	949
Gly Pro Gln His Ala Tyr Asp Asp Gly Gln Glu Ala Gly Ser Leu Pro	
1305 1310 1315	
CAT GCC AAC GGC TGG CCC CAG GCC CCC AGG CAG GAC CCC GCG AAG AAA	997
His Ala Asn Gly Trp Pro Gln Ala Pro Arg Gln Asp Pro Ala Lys Lys	
1320 1325 1330	

7/23

GCA ACC AGA GTC AGC CTC CAA GGC AGA GGG GAG AAC AAT GAA CTG CTC Ala Thr Arg Val Ser Leu Gln Gly Arg Gly Glu Asn Asn Glu Leu Leu 1335 1340 1345	1045
AAG GAG ATA GAG CCT GTG CTG AGC CTT CTC ACC AGT GGG AGC AGA GGG Lys Glu Ile Glu Pro Val Leu Ser Leu Leu Thr Ser Gly Ser Arg Gly 1350 1355 1360 1365	1093
GTC AAG GGA GGG GCA CCT GCC AAG GCA GAG ATG AAA GAT ATG GGA ATC Val Lys Gly Gly Ala Pro Ala Lys Ala Glu Met Lys Asp Met Gly Ile 1370 1375 1380	1141
CAG GTG GAC AGA GAT TTG GAC GGC AAG TCA CAC AAA CCT CTG CCC CTC Gln Val Asp Arg Asp Leu Asp Gly Lys Ser His Lys Pro Leu Pro Leu 1385 1390 1395	1189
GGC GTG GAG AAC GAC CGA GTC TTC AAT GAC CTA TGG GGG AAG GGC AAT Gly Val Glu Asn Asp Arg Val Phe Asn Asp Leu Trp Gly Lys Gly Asn 1400 1405 1410	1237
GTG CCT GTC GTC CTC AAC AAC CCA TAT TCA GAG AAG GAG CAG CCC CCC Val Pro Val Val Leu Asn Asn Pro Tyr Ser Glu Lys Glu Gln Pro Pro 1415 1420 1425	1285
ACC TCA GGA AAA CAG TCC CCC ACA AAG AAT GGC AGC CCC TCC AAG TGT Thr Ser Gly Lys Gln Ser Pro Thr Lys Asn Gly Ser Pro Ser Lys Cys 1430 1435 1440 1445	1333
CCA CGC TTC CTC AAG GTC AAG AAC TGG GAG ACT GAG GTG GTT CTC ACT Pro Arg Phe Leu Lys Val Lys Asn Trp Glu Thr Glu Val Val Leu Thr 1450 1455 1460	1381
GAC ACC CTC CAC CTT AAG AGC ACA TTG GAA ACG GGA TGC ACT GAG TAC Asp Thr Leu His Leu Lys Ser Thr Leu Glu Thr Gly Cys Thr Glu Tyr 1465 1470 1475	1429
ATC TGC ATG GGC TCC ATC ATG CAT CCT TCT CAG CAT GCA AGG AGG CCT Ile Cys Met Gly Ser Ile Met His Pro Ser Gln His Ala Arg Arg Pro 1480 1485 1490	1477
GAA GAC GTC CGC ACA AAA GGA CAG CTC TTC CCT CTC GCC AAA GAG TTT Glu Asp Val Arg Thr Lys Gly Gln Leu Phe Pro Leu Ala Lys Glu Phe 1495 1500 1505	1525
ATT GAT CAA TAC TAT TCA TCA ATT AAA AGA TTT GGC TCC AAA GCC CAC Ile Asp Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Phe Gly Ser Lys Ala His 1510 1515 1520 1525	1573
ATG GAA AGG CTG GAA GAG GTG AAC AAA GAG ATC GAC ACC ACT AGC ACT Met Glu Arg Leu Glu Glu Val Asn Lys Glu Ile Asp Thr Thr Ser Thr 1530 1535 1540	1621
TAC CAG CTC AAG GAC ACA GAG CTC ATC TAT GGG GCC AAG CAC GCC TGG Tyr Gln Leu Lys Asp Thr Glu Leu Ile Tyr Gly Ala Lys His Ala Trp 1545 1550 1555	1669
CGG AAT GCC TCG CGC TGT GTG GGC AGG ATC CAG TGG TCC AAG CTG CAG Arg Asn Ala Ser Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Ser Lys Leu Gln 1560 1565 1570	1717

8/23

GTA TTC GAT GCC CGT GAC TGC ACC ACG GCC CAC GGG ATG TTC AAC TAC Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Thr Thr Ala His Gly Met Phe Asn Tyr 1575 1580 1585	1765
ATC TGT AAC CAT GTC AAG TAT GCC ACC AAC AAA GGG AAC CTC AGG TCT Ile Cys Asn His Val Lys Tyr Ala Thr Asn Lys Gly Asn Leu Arg Ser 1590 1595 1600 1605	1813
GCC ATC ACC ATA TTC CCC CAG AGG ACA GAC GGC AAG CAC GAC TTC CGA Ala Ile Thr Ile Phe Pro Gln Arg Thr Asp Gly Lys His Asp Phe Arg 1610 1615 1620	1861
GTC TGG AAC TCC CAG CTC ATC CGC TAC GCT GGC TAC AAG CAC CGT GAC Val Trp Asn Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Ala Gly Tyr Lys His Arg Asp 1625 1630 1635	1909
GGC TCC ACC CTG GGG GAC CCA GCC AAT GTG CAG TTC ACA GAG ATA TGC Gly Ser Thr Leu Gly Asp Pro Ala Asn Val Gln Phe Thr Glu Ile Cys 1640 1645 1650	1957
ATA CAG CAG GGC TGG AAA CCG CCT AGA GGC CGC TTC GAT GTC CTG CCG Ile Gln Gln Gly Trp Lys Pro Pro Arg Gly Arg Phe Asp Val Leu Pro 1655 1660 1665	2005
CTC CTG CTT CAG GCC AAC GGC AAT GAC CCT GAG CTC TTC CAG ATT CCT Leu Leu Leu Gln Ala Asn Gly Asn Asp Pro Glu Leu Phe Gln Ile Pro 1670 1675 1680 1685	2053
CCA GAG CTG GTG TTG GAA CTT CCC ATC AGG CAC CCC AAG TTT GAG TGG Pro Glu Leu Val Leu Glu Leu Pro Ile Arg His Pro Lys Phe Glu Trp 1690 1695 1700	2101
TTC AAG GAC CTG GCG CTG AAG TGG TAC GGC CTC CCC GCC GTG TCC AAC Phe Lys Asp Leu Ala Leu Lys Trp Tyr Gly Leu Pro Ala Val Ser Asn 1705 1710 1715	2149
ATG CTC CTA GAG ATT GGC GGC CTG GAG TTC AGC GCC TGT CCC TTC AGT Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Ser Ala Cys Pro Phe Ser 1720 1725 1730	2197
GGC TGG TAC ATG GGC ACA GAG ATT GGT GTC CGC GAC TAC TGT GAC AAC Gly Trp Tyr Met Gly Thr Glu Ile Gly Val Arg Asp Tyr Cys Asp Asn 1735 1740 1745	2245
TCC CGC TAC AAT ATC CTG GAG GAA GTG GCC AAG AAG ATG AAC TTA GAC Ser Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Glu Val Ala Lys Lys Met Asn Leu Asp 1750 1755 1760 1765	2293
ATG AGG AAG ACG TCC TCC CTG TGG AAG GAC CAG GCG CTG GTG GAG ATC Met Arg Lys Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Gln Ala Leu Val Glu Ile 1770 1775 1780	2341
AAT ATC GCG GTT CTC TAT AGC TTC CAG AGT GAC AAA GTG ACC ATT GTT Asn Ile Ala Val Leu Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Lys Val Thr Ile Val 1785 1790 1795	2389
GAC CAT CAC TCC GCC ACC GAG TCC TTC ATT AAG CAC ATG GAG AAT GAG Asp His His Ser Ala Thr Glu Ser Phe Ile Lys His Met Glu Asn Glu 1800 1805 1810	2437

9/23

TAC CGC TGC CGG GGG GGC TGC CCT GCC GAC TGG GTG TGG ATC GTG CCC Tyr Arg Cys Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Val Trp Ile Val Pro 1815 1820 1825	2485
CCC ATG TCC GGA AGC ATC ACC CCT GTG TTC CAC CAG GAG ATG CTC AAC Pro Met Ser Gly Ser Ile Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Leu Asn 1830 1835 1840 1845	2533
TAC CGG CTC ACC CCC TCC TTC GAA TAC CAG CCT GAT CCC TGG AAC ACG Tyr Arg Leu Thr Pro Ser Phe Glu Tyr Gln Pro Asp Pro Trp Asn Thr 1850 1855 1860	2581
CAT GTC TGG AAA GGC ACC AAC GGG ACC CCC ACA AAG CGG CGA GCC ATC His Val Trp Lys Gly Thr Asn Gly Thr Pro Thr Lys Arg Ala Ile 1865 1870 1875	2629
GGC TTC AAG AAG CTA GCA GAA GCT GTC AAG TTC TCG GCC AAG CTG ATG Gly Phe Lys Lys Leu Ala Glu Ala Val Lys Phe Ser Ala Lys Leu Met 1880 1885 1890	2677
GGG CAG GCT ATG GCC AAG AGG GTG AAA GCG ACC ATC CTC TAT GCC ACA Gly Gln Ala Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Ala Thr 1895 1900 1905	2725
GAG ACA GGC AAA TCG CAA GCT TAT GCC AAG ACC TTG TGT GAG ATC TTC Glu Thr Gly Lys Ser Gln Ala Tyr Ala Lys Thr Leu Cys Glu Ile Phe 1910 1915 1920 1925	2773
AAA CAC GCC TTT GAT GCC AAG GTG ATG TCC ATG GAA GAA TAT GAC ATT Lys His Ala Phe Asp Ala Lys Val Met Ser Met Glu Glu Tyr Asp Ile 1930 1935 1940	2821
GTG CAC CTG GAA CAT GAA ACT CTG GTC CTT GTG GTC ACC AGC ACC TTT Val His Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe 1945 1950 1955	2869
GGC AAT GGA GAT CCC CCT GAG AAT GGG GAG AAA TTC GGC TGT GCT TTG Gly Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Lys Phe Gly Cys Ala Leu 1960 1965 1970	2917
ATG GAA ATG AGG CAC CCC AAC TCT GTG CAG GAA GAA AGG AAG AGC TAC Met Glu Met Arg His Pro Asn Ser Val Gln Glu Glu Arg Lys Ser Tyr 1975 1980 1985	2965
AAG GTC CGA TTC AAC AGC GTC TCC TCC TAC TCT GAC TCC CAA AAA TCA Lys Val Arg Phe Asn Ser Val Ser Ser Tyr Ser Asp Ser Gln Lys Ser 1990 1995 2000 2005	3013
TCA GGC GAT GGG CCC GAC CTC AGA GAC AAC TTT GAG AGT GCT GGA CCC Ser Gly Asp Gly Pro Asp Leu Arg Asp Asn Phe Glu Ser Ala Gly Pro 2010 2015 2020	3061
CTG GCC AAT GTG AGG TTC TCA GTT TTT GGC CTC GGC TCA CGA GCA TAC Leu Ala Asn Val Arg Phe Ser Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala Tyr 2025 2030 2035	3109
CCT CAC TTT TGC GCC TTC GGA CAC GCT GTG GAC ACC CTC CTG GAA GAA Pro His Phe Cys Ala Phe Gly His Ala Val Asp Thr Leu Leu Glu Glu 2040 2045 2050	3157
CTG GGA GGG GAG AGG ATC CTG AAG ATG AGG GAA GGG GAT GAG CTC TGT Leu Gly Gly Glu Arg Ile Leu Lys Met Arg Glu Gly Asp Glu Leu Cys 2055 2060 2065	3205

10/23

GGG CAG GAA GAG GCT TTC AGG ACC TGG GCC AAG AAG GTC TTC AAG GCA Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Thr Trp Ala Lys Lys Val Phe Lys Ala 2070 2075 2080 2085	3253
GCC TGT GAT GTC TTC TGT GTG GGA GAT GAT GTC AAC ATT GAA AAG GCC Ala Cys Asp Val Phe Cys Val Gly Asp Asp Val Asn Ile Glu Lys Ala 2090 2095 2100	3301
AAC AAT TCC CTC ATC AGC AAT GAT CGC AGC TGG AAG AGA AAC AAG TTC Asn Asn Ser Leu Ile Ser Asn Asp Arg Ser Trp Lys Arg Asn Lys Phe 2105 2110 2115	3349
CGC CTC ACC TTT GTG GCC GAA GCT CCA GAA CTC ACA CAA GGT CTA TCC Arg Leu Thr Phe Val Ala Glu Ala Pro Glu Leu Thr Gln Gly Leu Ser 2120 2125 2130	3397
AAT GTC CAC AAA AAG CGA GTC TCA GCT GCC CGG CTC CTT AGC CGT CAA Asn Val His Lys Lys Arg Val Ser Ala Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gln 2135 2140 2145	3445
AAC CTC CAG AGC CCT AAA TCC AGT CGG TCA ACT ATC TTC GTG CGT CTC Asn Leu Gln Ser Pro Lys Ser Ser Arg Ser Thr Ile Phe Val Arg Leu 2150 2155 2160 2165	3493
CAC ACC AAC GGG AGC CAG GAG CTG CAG TAC CAG CCT GGG GAC CAC CTG His Thr Asn Gly Ser Gln Glu Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Leu 2170 2175 2180	3541
GGT GTC TTC CCT GGC AAC CAC GAG GAC CTC GTG AAT GCC CTG ATC GAG Gly Val Phe Pro Gly Asn His Glu Asp Leu Val Asn Ala Leu Ile Glu 2185 2190 2195	3589
CGG CTG GAG GAC GCG CCG CCT GTC AAC CAG ATG GTG AAA GTG GAA CTG Arg Leu Glu Asp Ala Pro Pro Val Asn Gln Met Val Lys Val Glu Leu 2200 2205 2210	3637
CTG GAG GAG CGG AAC ACG GCT TTA GGT GTC ATC AGT AAC TGG ACA GAC Leu Glu Glu Arg Asn Thr Ala Leu Gly Val Ile Ser Asn Trp Thr Asp 2215 2220 2225	3685
GAG CTC CGC CTC CCG CCC TGC ACC ATC TTC CAG GCC TTC AAG TAC TAC Glu Leu Arg Leu Pro Pro Cys Thr Ile Phe Gln Ala Phe Lys Tyr Tyr 2230 2235 2240 2245	3733
CTG GAC ATC ACC ACG CCA CCA ACG CCT CTG CAG CTG CAG CAG TTT GCC Leu Asp Ile Thr Thr Pro Pro Thr Pro Leu Gln Leu Gln Gln Phe Ala 2250 2255 2260	3781
TCC CTA GCT ACC AGC GAG AAG GAG AAG CAG CGT CTG CTG GTC CTC AGC Ser Leu Ala Thr Ser Glu Lys Glu Lys Gln Arg Leu Leu Val Leu Ser 2265 2270 2275	3829
AAG GGT TTG CAG GAG TAC GAG GAA TGG AAA TGG GGC AAG AAC CCC ACC Lys Gly Leu Gln Glu Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Gly Lys Asn Pro Thr 2280 2285 2290	3877
ATC GTG GAG GTG CTG GAG GAG TTC CCA TCT ATC CAG ATG CCG GCC ACC Ile Val Glu Val Leu Glu Glu Phe Pro Ser Ile Gln Met Pro Ala Thr 2295 2300 2305	3925

11/23

CTG CTC CTG ACC CAG CTG TCC CTG CTG CAG CCC CGC TAC TAT TCC ATC Leu Leu Leu Thr Gln Leu Ser Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile 2310 2315 2320 2325	3973
AGC TCC TCC CCA GAC ATG TAC CCT GAT GAA GTG CAC CTC ACT GTG GCC Ser Ser Ser Pro Asp Met Tyr Pro Asp Glu Val His Leu Thr Val Ala 2330 2335 2340	4021
ATC GTT TCC TAC CGC ACT CGA GAT GGA GAA GGA CCA ATT CAC CAC GGC Ile Val Ser Tyr Arg Thr Arg Asp Gly Glu Gly Pro Ile His His Gly 2345 2350 2355	4069
GTA TGC TCC TCC TGG CTC AAC CGG ATA CAG GCT GAC GAA CTG GTC CCC Val Cys Ser Ser Trp Leu Asn Arg Ile Gln Ala Asp Glu Leu Val Pro 2360 2365 2370	4117
TGT TTC GTG AGA GGA GCA CCC AGC TTC CAC CTG CCC CGG AAC CCC CAA Cys Phe Val Arg Gly Ala Pro Ser Phe His Leu Pro Arg Asn Pro Gln 2375 2380 2385	4165
GTC CCC TGC ATC CTC GTT GGA CCA GGC ACC GGC ATT GCC CCT TTC CGA Val Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg 2390 2395 2400 2405	4213
AGC TTC TGG CAA CAG CGG CAA TTT GAT ATC CAA CAC AAA GGA ATG AAC Ser Phe Trp Gln Gln Arg Gln Phe Asp Ile Gln His Lys Gly Met Asn 2410 2415 2420	4261
CCC TGC CCC ATG GTC CTG GTC TTC GGG TGC CGG CAA TCC AAG ATA GAT Pro Cys Pro Met Val Leu Val Phe Gly Cys Arg Gln Ser Lys Ile Asp 2425 2430 2435	4309
CAT ATC TAC AGG GAA GAG ACC CTG CAG GCC AAG AAC AAG GGG GTC TTC His Ile Tyr Arg Glu Glu Thr Leu Gln Ala Lys Asn Lys Gly Val Phe 2440 2445 2450	4357
AGA GAG CTG TAC ACG GCT TAC TCC CGG GAG CCA GAC AAA CCA AAG AAG Arg Glu Leu Tyr Thr Ala Tyr Ser Arg Glu Pro Asp Lys Pro Lys Lys 2455 2460 2465	4405
TAC GTG CAG GAC ATC CTG CAG GAG CAG CTG GCG GAG TCT GTG TAC CGA Tyr Val Gln Asp Ile Leu Gln Glu Gln Leu Ala Glu Ser Val Tyr Arg 2470 2475 2480 2485	4453
GCC CTG AAG GAG CAA GGG GGC CAC ATA TAC GTC TGT GGG GAC GTC ACC Ala Leu Lys Glu Gln Gly Gly His Ile Tyr Val Cys Gly Asp Val Thr 2490 2495 2500	4501
ATG GCT GCT GAT GTC CTC AAA GCC ATC CAG CGC ATC ATG ACC CAG CAG Met Ala Ala Asp Val Leu Lys Ala Ile Gln Arg Ile Met Thr Gln Gln 2505 2510 2515	4549
GGG AAG CTC TCG GCA GAG GAC GCC GGC GTA TTC ATC AGC CGG ATG AGG Gly Lys Leu Ser Ala Glu Asp Ala Gly Val Phe Ile Ser Arg Met Arg 2520 2525 2530	4597
GAT GAC AAC CGA TAC CAT GAG GAT ATT TTT GGA GTC ACC CTG CGA ACG Asp Asp Asn Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Val Thr Leu Arg Thr 2535 2540 2545	4645
ATC GAA GTG ACC AAC CGC CTT AGA TCT GAG TCC ATT GCC TTC ATT GAA Ile Glu Val Thr Asn Arg Leu Arg Ser Glu Ser Ile Ala Phe Ile Glu 2550 2555 2560 2565	4693

WO 95/27070

PCT/EP95/01202

12/23

GAG AGC AAA AAA GAC ACC GAT GAG GTT TTC AGC TCC TAACTGGACC
Glu Ser Lys Lys Asp Thr Asp Glu Val Phe Ser Ser
2570 2575

4739

CTCTTGCCCA GCCGGCTGCA AGTTTGTAAG CGCGGGACAG A

4780

13/23

Figur 3

GAATTCGGCA CGAGGAGCCA CAGAGCAGAC GGAGGCCGCC CGTCCGGCCC CAGCGAC	57
ATG GGC AAC TTG AAG AGT GTG GGC CAG GAG CCC GGG CCC CCC TGC GGC Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Gly Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly 1435 1440 1445	105
CTG GGG CTG GGG CTG GGC CTC GGG CTA TGC GGC AAG CAG GGC CCA GCC Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala 1450 1455 1460 1465	153
TCC CCG GCA CCT GAG CCC AGC CGG GCC CCC GCA CCC GCC ACC CCG CAC Ser Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Pro Ala Thr Pro His 1470 1475 1480	201
GCG CCA GAC CAC AGC CCA GCT CCC AAC AGC CCC ACG CTG ACC CGG CCT Ala Pro Asp His Ser Pro Ala Pro Asn Ser Pro Thr Leu Thr Arg Pro 1485 1490 1495	249
CCG GAG GGG CCC AAG TTC CCT CGC GTG AAG AAC TGG GAG CTG GGG AGC Pro Glu Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Leu Gly Ser 1500 1505 1510	297
ATC ACC TAC GAC ACT CTG TGC GCG CAG TCC CAA CAG GAC GGG CCC TGC Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gln Gln Asp Gly Pro Cys 1515 1520 1525	345
ACT CCC AGG CGC TGC CTG GGC TCC CTG GTG TTG CCC CGG AAA CTG CAG Thr Pro Arg Arg Cys Leu Gly Ser Leu Val Leu Pro Arg Lys Leu Gln 1530 1535 1540 1545	393
ACC CGG CCC TCC CCG GGA CCT CCA CCC GCT GAG CAG CTG CTG AGC CAG Thr Arg Pro Ser Pro Gly Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Leu Ser Gln 1550 1555 1560	441
GCC AGG GAC TTC ATC AAC CAG TAC TAC AGC TCC ATC AAG AGG AGC GGC Ala Arg Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser Gly 1565 1570 1575	489
TCC CAG GCT CAC GAG GAG CGG CTT CAG GAG GTG GAG GCC GAG GTG GCA Ser Gln Ala His Glu Glu Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala 1580 1585 1590	537
TCC ACG GGC ACC ATC CAC CTC CGA GAG AGT GAG CTG GTG TTC GGG GCC Ser Thr Gly Thr Ile His Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala 1595 1600 1605	585
AAG CAG GCC TGG CGC AAT GCA CCC CGC TGC GTG GGC CGC ATC CAG TGG Lys Gln Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp 1610 1615 1620 1625	633
GGG AAG CTG CAG GTG TTT GAT GCC CGG GAC TGC AGC TCA GCA CAG GAG Gly Lys Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Ser Ser Ala Gln Glu 1630 1635 1640	681
ATG TTC ACC TAC ATC TGC AAC CAC ATC AAG TAC GCC ACC AAC CGC GGC Met Phe Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly 1645 1650 1655	729
AAC CTT CGC TCG GCC ATC ACA GTG TTC CCG CAG CGC GCC CCG GGC CGC Asn Leu Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Ala Pro Gly Arg 1660 1665 1670	777

14/23

GGA GAC TTC CGG ATC TGG AAC AGC CAG CTG GTG CGC TAC GCA GGC TAC Gly Asp Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr 1675 1680 1685	825
AGA CAG CAG GAT GGC TCT GTG CGT GGG GAC CCA GCC AAC GTG GAG ATC Arg Gln Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile 1690 1695 1700 1705	873
ACG GAG CTC TGC ATC CAG CAC GGC TGG ACC CCC GGA AAC GGC CGC TTC Thr Glu Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe 1710 1715 1720	921
GAC GTG CTG CCC CTG CTC CAG GCC CCA GAC GAG GCT CCA GAG CTC Asp Val Leu Pro Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu Ala Pro Glu Leu 1725 1730 1735	969
TTT GTT CTG CCC CCC GAG CTG GTC CTT GAA GTG CCC CTA GGA GCA CCC Phe Val Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Gly Ala Pro 1740 1745 1750	1017
CAC ACT GGA GTG GTT CGC GGC CCT GGG CTG CGA TGG TAT GCC CTC CCG His Thr Gly Val Val Arg Gly Pro Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro 1755 1760 1765	1065
GCC GTG TCC AAC ATG CTG CTG GAA ATC GGG GGT CTG GAG TTC TCC GCG Ala Val Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Ser Ala 1770 1775 1780 1785	1113
GCC CCC TTC AGC GGC TGG TAC ATG AGC ACG GAG ATT GGC ACG CGG AAC Ala Pro Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn 1790 1795 1800	1161
CTG TGT GAC CCT CAC CGC TAC AAT ATC CTG GAG GAT GTG GCC GTC TGC Leu Cys Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys 1805 1810 1815	1209
ATG GAC CTC GAC ACG CGG ACC ACC TCG TCC CTG TGG AAG GAC AAG GCG Met Asp Leu Asp Thr Arg Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala 1820 1825 1830	1257
GCC GTG GAG ATC AAC CTG GCT GTG CTG CAC AGC TTT CAG CTC GCC AAG Ala Val Glu Ile Asn Leu Ala Val Leu His Ser Phe Gln Leu Ala Lys 1835 1840 1845	1305
GTG ACC ATC GTG GAC CAC CAC GCC GCC ACG GTG TCC TTC ATG AAG CAC Val Thr Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Val Ser Phe Met Lys His 1850 1855 1860 1865	1353
CTG GAC AAC GAG CAG AAG GCC AGG GGG GGC TGC CCC GCC GAC TGG GCC Leu Asp Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala 1870 1875 1880	1401
TGG ATC GTG CCC CCC ATC TAC GGC AGC CTA CCG CCC GTC TTC CAC CAG Trp Ile Val Pro Pro Ile Tyr Gly Ser Leu Pro Pro Val Phe His Gln 1885 1890 1895	1449
GAG ATG GTC AAC TAC ATC CTG TCC CCT GCC TTC CGC TAC CAG CCA GAC Glu Met Val Asn Tyr Ile Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp 1900 1905 1910	1497

CCC TGG AAA GGG AGC GCG ACC AAG GGC GCC GGC ATC ACC AGG AAG AAG Pro Trp Lys Gly Ser Ala Thr Lys Gly Ala Gly Ile Thr Arg Lys Lys 1915 1920 1925	1545
ACC TTT AAG GAA GTG GCC AAC GCG GTG AAG ATC TCT GCC TCA CTC ATG Thr Phe Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met 1930 1935 1940 1945	1593
GGC ACC CTG ATG GCC AAG CGA GTG AAA GCA ACC ATC CTG TAC GCC TCT Gly Thr Leu Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Ala Ser 1950 1955 1960	1641
GAG ACC GGC CGG GCC CAG AGC TAC GCT CAG CAG CTG GGG AGG CTC TTC Glu Thr Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe 1965 1970 1975	1689
CGG AAG GCC TTC GAT CCC CGG GTC CTG TGC ATG GAT GAG TAT GAC GTG Arg Lys Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val 1980 1985 1990	1737
GTG TCC CTG GAG CAC GAG GCA CTG GTG CTG GTG GTG ACC AGC ACC TTT Val Ser Leu Glu His Glu Ala Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe 1995 2000 2005	1785
GGG AAT GGC GAT CCC CCG GAG AAT GGA GAG AGT TTT GCA GCT GCC CTG Gly Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu 2010 2015 2020 2025	1833
ATG GAG ATG TCG GGG CCC TAC AAC AGC TCC CCA CGG CCG GAA CAG CAC Met Glu Met Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His 2030 2035 2040	1881
AAG AGT TAC AAG ATC CGC TTC AAC AGC GTC TCC TGC TCA GAC CCG CTG Lys Ser Tyr Lys Ile Arg Phe Asn Ser Val Ser Cys Ser Asp Pro Leu 2045 2050 2055	1929
GTG TCC TCC TGG CGG CGG AAG AGA AAG GAG TCC AGC AAC ACA GAC AGC Val Ser Ser Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser 2060 2065 2070	1977
GCG GGG GCC CTG GGG ACC CTC AGG TTC TGT GTG TTC GGA CTG GGC TCC Ala Gly Ala Leu Gly Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser 2075 2080 2085	2025
CGG GCG TAC CCC CAC TTC TGC GCC TTC GCG CGA GCG GTG GAC ACC CGG Arg Ala Tyr Pro His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg 2090 2095 2100 2105	2073
CTG GAA GAG CTT GGA GGG GAG CGG CTG CTG CAG CTG GGC CAG GGC GAT Leu Glu Glu Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp 2110 2115 2120	2121
GAG CTC TGC GGC CAG GAA GAG GCC TTC CGT GGT TGG GCA AAG GCG GCA Glu Leu Cys Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Lys Ala Ala 2125 2130 2135	2169
TTC CAG GCC TCC TGC GAG ACG TTC TGC GTT GGG GAG GAG GCC AAG GCT Phe Gln Ala Ser Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Glu Ala Lys Ala 2140 2145 2150	2217
GCT GCC CAG GAC ATC TTC AGC CCC AAA CGG AGC TGG AAA CGC CAG AGG Ala Ala Gln Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg 2155 2160 2165	2265

16/23

TAC CGG CTG AGC GCC CAG GCC GAG GGC CTC CAG CTG CTG CCA GGC CTG Tyr Arg Leu Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu 2170 2175 2180 2185	2313
ATC CAC GTG CAC AGA CGG AAG ATG TTT CAG GCC ACA GTC CTC TCG GTG Ile His Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Val Leu Ser Val 2190 2195 2200	2361
GAA AAT CTG CAA AGC AGC AAG TCC ACC CGG GCC ACC ATC CTG GTG CGC Glu Asn Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu Val Arg 2205 2210 2215	2409
CTG GAC ACT GCA GGC CAG GAG GGG CTG CAG TAC CAG CCG GGG GAC CAC Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His 2220 2225 2230	2457
ATA GGC ATC TCC GCG CCC AAC CGG CCG GGC CTG GTG GAG GCG CTG CTG Ile Gly Ile Ser Ala Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val Glu Ala Leu Leu 2235 2240 2245	2505
AGC CGC GTG GAG GAC CCG CCA CCG CCC ACC GAG TCT GTG GCT GTG GAG Ser Arg Val Glu Asp Pro Pro Pro Pro Thr Glu Ser Val Ala Val Glu 2250 2255 2260 2265	2553
CAG CTG GAG AAA GGC AGC CCA GGC GGC CCT CCT CCC AGC TGG GTG CGG Gln Leu Glu Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro Pro Pro Ser Trp Val Arg 2270 2275 2280	2601
GAC CCA CGG CTG CCC CCG TGC ACC GTG CGC CAG GCT CTC ACC TTC TTC Asp Pro Arg Leu Pro Pro Cys Thr Val Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe 2285 2290 2295	2649
CTG GAC ATC ACC TCC CCA CCC AGC CCC CGG CTT CTC CGA CTG CTC AGC Leu Asp Ile Thr Ser Pro Pro Ser Pro Arg Leu Leu Arg Leu Leu Ser 2300 2305 2310	2697
ACC CTG GCC GAA GAA CCC AGC GAG CAG CAG GAG CTT GAG ACC CTC AGT Thr Leu Ala Glu Glu Pro Ser Glu Gln Gln Glu Leu Glu Thr Leu Ser 2315 2320 2325	2745
CAG GAC CCC CGG CGC TAC GAG GAG TGG AAG TTG GTC CGC TGC CCC ACG Gln Asp Pro Arg Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Leu Val Arg Cys Pro Thr 2330 2335 2340 2345	2793
CTG CTG GAG GTG CTG GAG CAG TTC CCG TCC GTG GCG CTG CCC GCC CCG Leu Leu Glu Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro 2350 2355 2360	2841
CTG CTC CTC ACC CAG CTG CCC CTG CTG CAG CCC CGG TAC TAC TCT GTC Leu Leu Leu Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val 2365 2370 2375	2889
AGC TCG GCC CCC AAC GCC CAC CCC GGA GAG GTC CAC CTC ACA GTG GCC Ser Ser Ala Pro Asn Ala His Pro Gly Glu Val His Leu Thr Val Ala 2380 2385 2390	2937
GTG CTG GCG TAC AGG ACC CAA GAT GGG CTG GGC CCC CTA CAC TAC GGG Val Leu Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly 2395 2400 2405	2985

17/23

GTC TGC TCC ACA TGG CTG AGC CAG CTC AAG ACT GGA GAC CCC GTG CCC Val Cys Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Thr Gly Asp Pro Val Pro 2410 2415 2420 2425	3033
TGC TTC ATC AGG GGG GCT CCC TCC TTC CGG CTG CCG CCT GAC CCC TAC Cys Phe Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Tyr 2430 2435 2440	3081
GTG CCC TGC ATC CTC GTG GGC CCT GGC ACT GGC ATC GCC CCC TTC CGG Val Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg 2445 2450 2455	3129
GGA TTT TGG CAG GAG AGG CTG CAT GAC ATT GAG AGC AAA GGG CTG CAG Gly Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln 2460 2465 2470	3177
CCG CAC CCC ATG ACC CTG GTG TTC GGC TGC CGC TGC TCC CAA CTC GAC Pro His Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu Asp 2475 2480 2485	3225
CAT CTC TAC CGC GAC GAG GTG CAG GAC GCC CAG GAG CGC GGG GTG TTT His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asp Ala Gln Glu Arg Gly Val Phe 2490 2495 2500 2505	3273
GGC CGC GTC CTC ACC GCC TTC TCC CGG GAA CCT GAC AGC CCC AAG ACC Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Ser Pro Lys Thr 2510 2515 2520	3321
TAC GTA CAG GAC ATC CTG AGA ACC GAG CTG GCT GCC GAG GTG CAC CGC Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala Glu Val His Arg 2525 2530 2535	3369
GTG CTG TGC CTC GAG CGG GGC CAC ATG TTT GTC TGC GGC GAT GTC ACT Val Leu Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr 2540 2545 2550	3417
ATG GCA ACC AGC GTC CTG CAG ACG GTG CAG CGC ATC TTG GCG ACA GAG Met Ala Thr Ser Val Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu 2555 2560 2565	3465
GGC GAC ATG GAG CTG GAC GAG GCG GGC GAC GTC ATC GGC GTG CTG CGG Gly Asp Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg 2570 2575 2580 2585	3513
GAT CAG CAA CGC TAT CAC GAG GAC ATT TTC GGC CTC ACG CTG CGC ACC Asp Gln Gln Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr 2590 2595 2600	3561
CAG GAG GTG ACA AGC CGT ATA CGT ACC CAG AGC TTT TCC CTG CAG GAG Gln Glu Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu 2605 2610 2615	3609
CGG CAT CTG CGG GGC GCG GTG CCC TGG GCC TTC GAC CCG CCC GGC CCA Arg His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro 2620 2625 2630	3657
GAC ACC CCC GGC CCC TGAGACCCCT CTTGCTTCCC ACTGCAGTTC CCGGAGAGAG Asp Thr Pro Gly Pro 2635	3712
GGGCTGTCAT TCCACTATGG CTCTACCGCT GTCCTGTTGG CCTTTACCGG GACCGGCCAC	3772
CTCTCCCTCC CCTCCCAAGG TGACTTCCCA GAGACTGTTG GATTCCCTGT ACTATCTCAT	3832

18/23

CCTCTCATCT CTAGGTCTGT TTCCCCACCC TAAGTCCATC TGAAGACCC CTCCCAGCAG	3892
CGGTATTCCA GAGCCTACAG TCAGCCCTTT GGTGTTTAGG TGAATTTTAG ATTCCCCTCG	3952
CCTCTCTCCC GGAAGTATC TTATCTTGAA ACCTGATCTC TAAATCATTC AAATATTTAT	4012
TATTGAAGAT TTACCATAAG AGACTGGACC AGAAGTTAGG AGACCTACTA AGATGCCTAA	4072
GCCAAGGTCC TCCGGGGCCG AATTC	4097

19/23

Fig. 4a

pSP65h - CMV1

-(2166 bps)

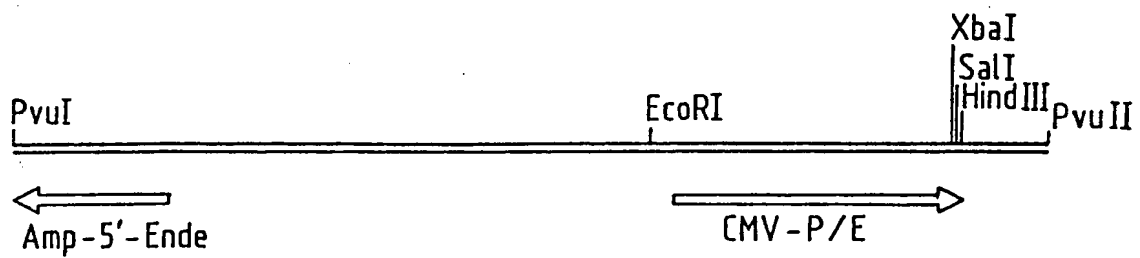
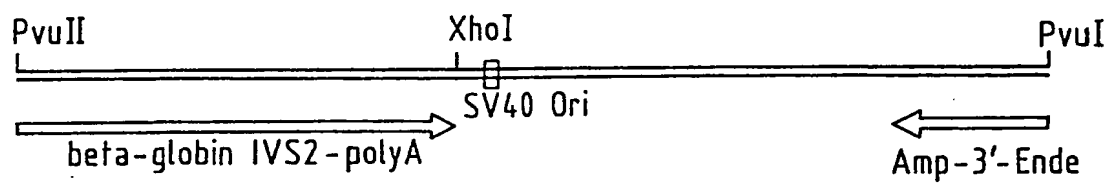


Fig. 4b

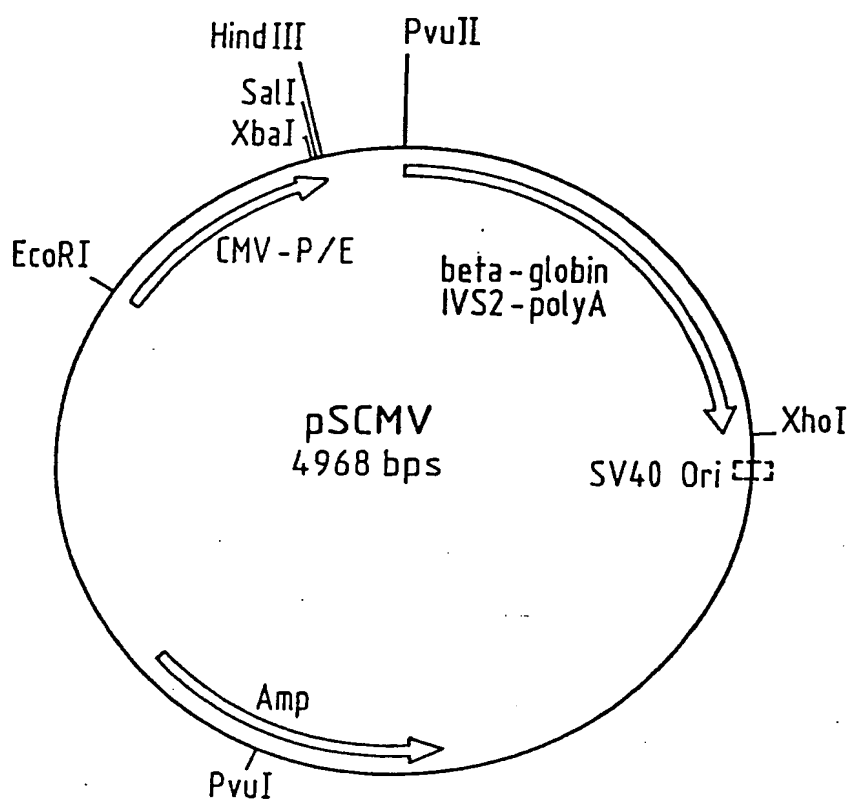
PSCT GALX-556

(2802 bps)



21/23

Fig. 4c



22/23

Fig. 4 d

iNOS (3970 bps)

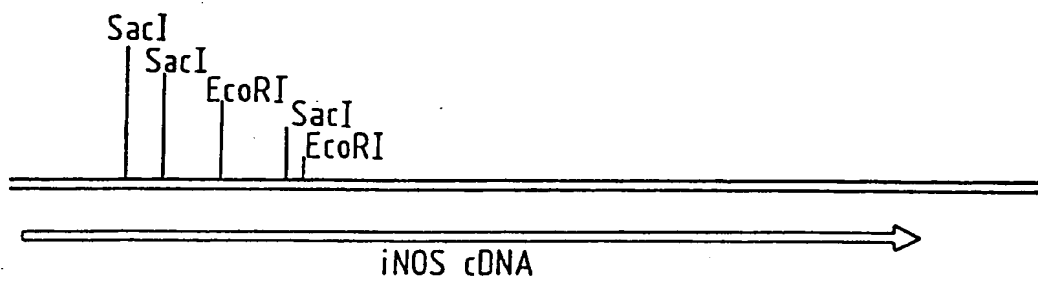
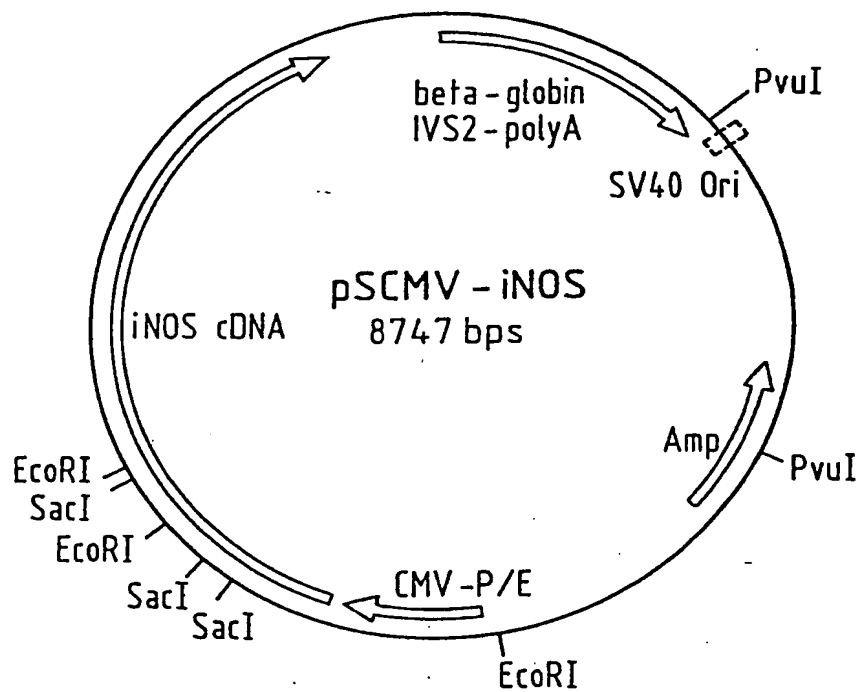


Fig. 4 e



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No
PCT/EP 95/01202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C12N9/00 C07K14/00 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO-A-94 24269 (NOVO NORDISK A/S) 27 October 1994 see the whole document ----	1-4,6,10
X	FEBS LETTERS, vol. 316, no. 2, January 1993 pages 175-180, M. NAKANE ET AL. 'Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle' see the whole document -----	1-7,10
Y	----- -/--	8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 1995

Date of mailing of the international search report

19.09.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No
PCT/EP 95/01202

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, vol. 89, August 1992 pages 6711-6715, C.J. LOWENSTEIN ET AL. 'Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme' see the whole document ---	1-7,10
Y	---	8
X	J.BIOL.CHEM., vol. 267, no. 21, July 1992 pages 14519-14522, S.P. JANSSENS ET AL. 'Cloning and Expression of a cDNA Encoding Human Endothelium-derived Relaxing Factor/Nitric Oxide synthase' see the whole document ---	1-4,6,10
Y	---	5
X	BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN., vol. 196, no. 3, November 1993 pages 1481-1489, I.G. CHARLES ET AL. 'Cloning and Expression of a Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase Coding Sequence in a Baculovirus/Insect Cell System' see the whole document ---	1-4,6,10
Y	---	5
Y	JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARIOLOGY, vol. 1A, no. 484A, February 1994 page 235a L.J. FELDMAN ET AL. 'Site specificity of adenovirus-mediated gene transfer by hydrogel-coated balloon. A histochemical and PCR analysis. Abstract No: 906-34' see the whole document ---	10-12
Y	CIRCULATION, vol. 88, no. 4(2), October 1993 page I-660 P.G. STEG ET AL. 'Local Delivery of Adenovirus for percutaneous Arterial Gene Transfer. A Comparison of Double and Hydrogel-Coated Balloons. Abstract No: 3554' see the whole document ---	10-12
Y	ARCHIVES OF SURGERY, vol. 128, November 1993 pages 1212-1220, D.A. GELLER ET AL. 'Should Surgeons Clone Genes?' see page 1218, right column, line 9 - page 1219, left column, line 19 see page 1215, left column, line 4 - right column, line 25 ---	10-12
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/01202

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EMBL MAMMALIAN Accession no. M95674, 24 June 1992 see abstract & W.C. Sessa et al. 'Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase' (Unpublished)</p> <p>-----</p>	5

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Publication No

PCT/EP 95/01202

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9424269	27-10-94	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Zeichen
PCT/EP 95/01202

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/86 C12N9/00 C07K14/00 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO-A-94 24269 (NOVO NORDISK A/S) 27.Oktober 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-4,6,10
X	FEBS LETTERS, Bd. 316, Nr. 2, Januar 1993 Seiten 175-180, M. NAKANE ET AL. 'Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle' siehe das ganze Dokument ---	1-7,10
Y	---	8
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. September 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19.09.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Donath, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, Bd. 89, August 1992 Seiten 6711-6715, C.J. LOWENSTEIN ET AL. 'Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme' siehe das ganze Dokument	1-7,10
Y	---	8
X	J.BIOL.CHEM., Bd. 267, Nr. 21, Juli 1992 Seiten 14519-14522, S.P. JANSSENS ET AL. 'Cloning and Expression of a cDNA Encoding Human Endothelium-derived Relaxing Factor/Nitric Oxide synthase' siehe das ganze Dokument	1-4,6,10
Y	---	5
X	BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN., Bd. 196, Nr. 3, November 1993 Seiten 1481-1489, I.G. CHARLES ET AL. 'Cloning and Expression of a Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase Coding Sequence in a Baculovirus/Insect Cell System' siehe das ganze Dokument	1-4,6,10
Y	---	5
Y	JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, Bd. 1A, Nr. 484A, Februar 1994 Seite 235a L.J. FELDMAN ET AL. 'Site specificity of adenovirus-mediated gene transfer by hydrogel-coated balloon. A histochemical and PCR analysis. Abstract No: 906-34' siehe das ganze Dokument	10-12
Y	---	10-12
Y	CIRCULATION, Bd. 88, Nr. 4(2), Oktober 1993 Seite I-660 P.G. STEG ET AL. 'Local Delivery of Adenovirus for percutaneous Arterial Gene Transfer. A Comparison of Double and Hydrogel-Coated Balloons. Abstract No: 3554' siehe das ganze Dokument	10-12
Y	---	10-12
Y	ARCHIVES OF SURGERY, Bd. 128, November 1993 Seiten 1212-1220, D.A. GELLER ET AL. 'Should Surgeons Clone Genes?' siehe Seite 1218, rechte Spalte, Zeile 9 - Seite 1219, linke Spalte, Zeile 19 siehe Seite 1215, linke Spalte, Zeile 4 - rechte Spalte, Zeile 25 ---	10-12
	---	---

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE EMBL MAMMALIAN Accession no. M95674, 24.Juni 1992 siehe Zusammenfassung & W.C. Sessa et al. 'Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase' (Unpublished)</p> <p>-----</p>	5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Patentsymbol
PCT/EP 95/01202

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9424269	27-10-94	KEINE	